

19 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

12 Offenlegungsschrift  
11 DE 3430894 A1

21 Aktenzeichen: P 34 30 894.6  
22 Anmeldetag: 22. 8. 84  
43 Offenlegungstag: 14. 3. 85

51 Int. Cl. 3:  
**A61K 39/116**  
A 61 K 39/106  
A 61 K 39/108  
A 61 K 39/385

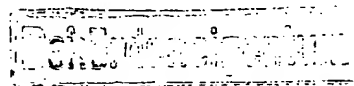
DE 3430894 A1

30 Unionspriorität: 32 33 31  
23.08.83 IL 69558

71 Anmelder:  
Yeda Research and Development Co., Ltd., Rehovot,  
IL

74 Vertreter:  
Vossius, V., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Vossius, D.,  
Dipl.-Chem.; Tauchner, P., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.;  
Heunemann, D., Dipl.-Phys. Dr.rer.nat.; Rauh, P.,  
Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., Pat.-Anw., 8000 München

72 Erfinder:  
Sela, Michael; Arnon, Ruth, Rehovot, IL; Jacob,  
Chaim O., Petach Tikva, IL



54 <sup>Leat</sup>Impfstoff gegen Cholera und gegen Hitze-labiles E. coli-Toxin

Es wird ein synthetischer Impfstoff gegen Cholera und Hitze-labiles E.coli-Toxin bereitgestellt, der eine Verbindung eines hochmolekularen Trägers mit einem synthetischen Polypeptid enthält, das in seiner Sequenz einem Teil der Untereinheit B des natürlichen Cholera-Toxins entspricht. Die Sequenzen entsprechen beispielsweise den Aminosäure-Positionen 45 bis 64, 50 bis 64 und 8 bis 20 der Untereinheit B oder diesen ähnlichen, jedoch leicht modifizierten Sequenzen.

VOSSIUS · VOSSIUS · TAUCHNER · HEUNEMANN · RAUH  
PATENTANWÄLTE

SIEBERTSTRASSE 4 · 8000 MÜNCHEN 86 · PHONE: (089) 47 40 75  
CABLE: BENZOLPATENT MÜNCHEN · TELEX 5-29 453 VOPAT D

3430894

22. August 1984

5 u.Z.: T 229 (Ra/Jae/Ke)  
Case: T/546

YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT COMPANY LIMITED  
Rehovot, Israel

10

---

"Impfstoff gegen Cholera und gegen Hitze-labiles  
E. coli-Toxin"

---

15

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Impfstoff gegen Cholera und gegen Hitze-labiles E.  
coli-Toxin, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,  
20 daß er ein / Verknüpfungsprodukt aus einem hochmolekularen Träger mit  
einem Polypeptid umfaßt, das einem Teil der Sequenz der Un-  
tereinheit B des natürlichen Cholera-toxins entspricht.
2. Impfstoff nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß  
25 das Polypeptid synthetischen Ursprungs ist.
3. Impfstoff nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeich-  
net, daß die Sequenz im wesentlichen den Aminosäurepositionen  
50 bis 64 der Untereinheit B des Cholera-toxins entspricht.  
30
4. Impfstoff nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß  
das Polypeptid im wesentlichen die Sequenz Val-Glu-Val-Pro-  
Gly-Ser-Gln-His-Ile-Asp-Ser-Gln-Lys-Lys-Ala aufweist.
- 35 5. Impfstoff nach Anspruch 1 / <sup>oder 2,</sup> dadurch gekennzeichnet, daß  
die Sequenz im wesentlichen den Aminosäurepositionen 8 bis  
20 der Untereinheit B des Cholera-toxins entspricht.

- 1 6. Impfstoff nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß  
das Polypeptid im wesentlichen die Sequenz Leu-Cyc-Ala-Glu-  
Tyr-His-Asn-Thr-Gln-Ile-his-Thr-Leu aufweist.
- 5 7. Impfstoff nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet,  
daß die Sequenz im wesentlichen den Aminosäurepositionen  
45 bis 64 der Untereinheit B des Choleratoxins entspricht.
- 10 8. Impfstoff nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß  
das Polypeptid im wesentlichen die Sequenz Gly-Ala-Thr-Phe-  
Glu-Val-Glu-Val-Pro-Gly-Ser-Gln-His-Ile-Asp-Ser-Gln-Lys-Lys-  
Ala aufweist.
- 15 9. Impfstoff nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß  
der hochmolekulare Träger ein Toxoid ist.
10. Impfstoff nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß  
das Toxoid Tetanus-Toxoid ist.
- 20 11. Impfstoff nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß  
der hochmolekulare Träger ein Polymerisat des Poly AL-Typs  
mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von mindestens  
50000 ist.
- 25 12. Verwendung des Impfstoffs nach Anspruch 1 bis 11, gege-  
benenfalls zusammen mit einem geeigneten Adjuvants oder Ver-  
dünnungsmittel, zur Erzeugung von Immunität gegen Cholera-  
toxin und Hitze-labiles E. coli-Toxin.

30

35

1

5 Die Erfindung bezieht sich auf Impfstoffe, die dazu geeignet  
sind, selektive Immunität gegen Choleratoxin (CT) und Hitze-  
labiles E.coli-Toxin (LT von E. coli) zu induzieren. Die  
10 Impfstoffe enthalten ein Verknüpfungsprodukt eines hochmole-  
kularen Anteils mit einem Polypeptid, das einem be-  
stimmten, verhältnismäßig kurzen Teil der Untereinheit B des  
natürlichen Toxins entspricht. Beispielsweise werden Poly-  
peptide verwendet, die den Aminosäurepositionen 50 bis 64,  
8 bis 20 und 45 bis 64 der Untereinheit B des natürlichen  
Choleratoxins entsprechen. Der Träger ist ein  
15 geeignetes Toxoid, wie das Tetanustoxoid, oder ein synthe-  
tisches Polymer mit angemessenem Molekulargewicht, wie  
Poly AL (ein Alanin-Lysin-Polymer) mit einem Molekularge-  
wicht von mindestens etwa 50 000 und vorzugsweise etwa  
100 000. Die Polypeptide sind vorzugsweise synthetischen Ur-  
20 sprungs und können mit Hilfe bekannter Methoden der Polypep-  
tidsynthese, wie der Festphasen-Synthese nach Merrifield, synthetisiert  
werden.

Antiseren gegen die Sequenz der Aminosäuren 50 bis 64 neutra-  
lisieren in signifikanter Weise die biologische Aktivität  
25 sowohl des Choleratoxins als auch/<sup>des</sup> Hitze-labilen E. coli-  
Toxins.

Geeignete synthetische Peptide, die an passende Träger gebun-  
den sind, induzieren Antikörper, die mit Proteinen kreuzrea-  
30 gieren können, die solche Peptidsequenzen enthalten. Dies  
wurde bereits für das Hühnereiweiß-Lysozym, das  
Hüllprotein des Bacteriophagen MS2 sowie das Influenza-  
Hämagglutinin/<sup>gezeigt.</sup> Ähnliche Ergebnisse sind für das Protein M  
von Streptococcus pyogenes, das Diphtherietoxin, das Hepati-  
35 tis-Virus und das Maul- und Klauenseuche-Virus berichtet  
worden. In verschiedenen Fällen konnten die Antikörper die

1 biologische Aktivität von Viren und Toxinen neutralisieren.

Es ist die Aufgabe der vorliegenden Erfindung, synthetische Peptide bereitzustellen, die Antikörper induzieren können,  
5 welche wirksam das Choleratoxin und andere ähnliche Toxine, wie das Hitze-labile E. coli-Toxin neutralisieren. Das Vibrio cholera-Toxin besteht aus/<sup>den</sup>zwei Untereinheiten A und B. Die Untereinheit A aktiviert die Adenylatcyclase, die die biologische Aktivität steuert, die Untereinheit B dagegen ist  
10 verantwortlich für die Bindung an zelluläre Rezeptoren und enthält die meisten immunogenen Determinanten. Antikörper gegen die Untereinheit B können die biologische Aktivität des intakten Toxins neutralisieren. Jedes Monomer der pentameren Untereinheit B (Choleraagenoid) besteht aus einer Kette von  
15 103 Aminosäureresten.

Die Erfindung bezieht sich auf die Synthese verschiedener Peptide der Untereinheit B des Choleratoxins und auf Antikörper, die sowohl das intakte Choleratoxin, als auch andere  
20 Toxine, wie das Hitze-labile E.coli Toxin, neutralisieren.

Es werden synthetische Impfstoffe gegen Choleratoxine und Hitze-labile E. coli-Toxin bereitgestellt. Diese enthalten ein geeignetes Polypeptid, das einem bestimmten Bereich der  
25 Untereinheit B des Choleratoxins entspricht und an einen geeigneten polymeren hochmolekularen Träger, wie geeignete Toxoide (Tetanustoxoid oder ähnliche) oder geeignete Polymere, wie Poly AL mit einem Molekulargewicht von mindestens etwa 50 000 und vorzugsweise etwa 100 000 bis  
30 120 000, <sup>gebunden ist.</sup> Geeignete synthetische Polypeptide entsprechen entweder den Aminosäurepositionen 50 bis 64, 45 bis 64 oder 8 bis 20 der Untereinheit B des Choleratoxins. Die Aminosäuren 50 bis 64 der Untereinheit B des Choleratoxins entsprechen der Sequenz Val-Glu-Val-Pro-Gly-Ser-Gln-His-Ile-Asp-Ser-  
35 Gln-Lys-Lys-Ala, die Aminosäuren 8 bis 20 der Sequenz Leu-Cys-Ala-Glu-Tyr-His-Asn-Thr-Gln-Ile-His-Thr-Leu und

- 1 die Aminosäuren 45 bis 64 der Sequenz Gly-Ala-Thr-Phe-Glu-Val-Glu-Val-Pro-Gly-Ser-Gln-His-Ile-Asp-Ser-Gln-Lys-Lys-Ala. In der Sequenz der Aminosäurepositionen 50 bis 64 ist es möglich, das aminoterminal Val durch beliebige andere Aminosäuren zu ersetzen. Anstelle des carboxyterminalen Ala kann Cys inseriert werden. Auf diese Art und Weise modifizierte Polypeptide haben eine ähnliche oder sogar eine bessere Aktivität.
- 5
- 10 In die Sequenz der Aminosäurepositionen 8 bis 20 kann anstelle von Cys die Aminosäure Ala eingesetzt werden. Die erhaltene Aktivität ist ähnlich. Dies wurde durch Experimente ermittelt.
- 15 Es ist klar, daß auch leichte Modifikationen in Bezug auf Kettenlänge und Zusammensetzung der vorstehend definierten Sequenzen verwendet werden können, ohne von der Erfindung abzuweichen.
- 20 Um die Antikörperbildung zu induzieren, muß das Polypeptid an einen geeigneten Träger mit geeignetem Molekulargewicht gebunden sein. Das Tetanustoxoid hat sich als geeigneter Träger erwiesen. Ebenso kann jedes geeignete Polymer verwendet werden, vorzugsweise besteht dies aus Aminosäuren wie
- 25 Poly AL (ein Alanin-Lysin-Copolymer) mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von etwa 100 000 bis 120 000. Anscheinend wird ein Molekulargewicht von mindestens 50 000 benötigt.
- 30 Es wurde gefunden, daß die synthetischen Impfstoffe auch gegen Hitze-labiles Toxin von E. coli (LT von E. coli) wirksam sind. Antikörper gegen die beiden Peptide neutralisieren sowohl die Aktivität des LT von E. coli als auch die des Choleratoxins (CT). Das dritte Polypeptid, mit der Sequenz
- 35 der Aminosäurepositionen 45 bis 64 hat eine leicht bessere Wirksamkeit als das mit der Sequenz der Aminosäurepositionen

- 1 50 bis 64. Durch Radioimmunoassay und den Immuno-Blotting-Test wurde die Kreuzreaktivität von anti-(8-20-Polypeptid) / <sup>-Antikörpern</sup> und anti-(50-64-Polypeptid) / <sup>-Antikörpern</sup> mit dem LT von E. coli nachgewiesen. Die Neutralisierung des LT-E. coli verhindert die
- 5 Induktion der Adenylatcyclase-Aktivität durch das Toxin, die Flüssigkeitsezernierung in abgeordneten Ileumschleifen des Rattendarms und die Induktion der Adenylatcyclase-Aktivität durch Choleratoxin.
- 10 Das nachstehende Beispiel erläutert die Erfindung.

### B e i s p i e l

15 Choleratoxin wurde gekauft. Die Trennung der Untereinheiten und die Isolation der Untereinheit B wurde durch Gelfiltration durch Sephadex G-75 nach der Methode von C.Y. Lai ("CRC Critical Reviews" Bioch 9, S. 171 - 207 (1980)) in 5prozentiger Ameisensäure durchgeführt. / <sup>Die</sup> t-Butyloxycarbonyl-(t-boc)-Derivate der verschiedenen Aminosäuren wurden ebenfalls gekauft. Alle anderen Reagenzien weisen die für analytische Zwecke erforderliche oder die beste verfügbare Reinheit auf.

#### Peptidsynthese:

25 Die Peptide wurden nach der Festphasen-Methode von B.B. Merrifield (Sci. 150, Seiten 178 bis 185 (1965)) synthetisiert. Dabei wurden folgende Seitenketten-Schutzgruppen der t-boc-Derivate verwendet: Benzyläther für die Hydroxylgruppen von Serin und Threonin, Dichlorbenzyläther für die phenolische

30 Hydroxylgruppe des Tyrosins, und Carbobenzoxy-Gruppen für die  $\epsilon$ -Aminogruppe von Lysin. Die  $\alpha$ -Carboxyl-Gruppe von Asparagin und Glutamin wurde durch Veresterung mit p-Nitrophenol geschützt. Die Nitroguanidino-Gruppe von Arginin und die Imidazol-Gruppe von Histidin wurden durch Tosyl-Gruppen geschützt. Das Ausgangs-Aminosäure-Harz wurde durch Veresterung der entsprechenden t-boc-Aminosäure mit dem Chlor-methylierten Harz

35

1 (Polystyrol - 1 % Divinylbenzol) hergestellt.

Das Fortschreiten der Synthesereaktion wurde durch Ninhydrin-Analyse überwacht. Wenn sich aus Ninhydrin-Test und Aminosäure-Analyse ergab, daß die Kopplungsreaktion zu weniger  
5 als 99 % abgelaufen war, wurden zwei Kopplungsreaktionszyklen durchgeführt. Bei der Synthese von CTP 6 wurden zur Verhinderung der Oxidation von Tryptophan 5 % (v/v) 1,2-Äthandithiol zur Trichloressigsäure zugegeben. Die Schutzgruppen  
10 wurden entfernt und die Peptide wurden vom Harz bei 0°C durch Behandlung mit wasserfreiem HF (Fluor-Wasserstoff), der 10 % Anisol und 1 % 1,2-Äthandithiol als Spülmittel enthielt, abgetrennt.

15 Die nach dem Abtrennen vom Harz wiedergewonnenen Rohpeptide wurden mit Sephadex G-25 Säulen gereinigt. Die Reinheit der Peptide wurde durch Aminosäure-Analyse, Gegenstromhochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) und/oder Hochspannungspapierelektrophorese geprüft.

20

#### Verknüpfung der Peptide mit Tetanus-Toxoid

Zwei Verknüpfungsmethoden wurden angewendet:

25 I) 1-Äthyl-3-(3'-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-hydrochlorid als Kopplungsagens (nach Müller et al., Proc. Nat. Acad. Sci, USA 79, Seiten 569 bis 573 (1982)).

II) Während es sich noch am Harz befand, wurde das Peptid  
30 vor der HF-Spaltung durch t-boc-p-Aminophenyllessigsäure (PAPA) verlängert. Die PAPA-Peptide wurden in kalter 2 N Salzsäure gelöst, durch Zugabe von eiskalter wäßriger Natriumnitritlösung (0,1 molar) diazotiert und zu einer Lösung von Tetanustoxoid in  $\text{NaHCO}_3$  (0,5 molar) zugegeben. Da-  
35 bei wurde der pH-Wert durch Zugabe von konzentriertem  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  auf 8,5 gehalten. Das Reaktionsgemisch wurde nach 10 Stun-

- 1 den bei 4°C gegen 10 mM Ammoniumcarbonat dialysiert und gefriergetrocknet. Der Peptidgehalt der Verknüpfungsprodukte, wurde, sofern möglich, durch Aminosäureanalyse und Markierung mit <sup>125</sup>J bestimmt.

5

#### Immunisierungsverfahren

- Kaninchen wurden, wie von Müller et al. (Proc. Nat. Acad. Sci. USA 79, Seiten 569 - 573 (1982)) beschrieben, durch an mehreren Stellen verabreichte intradermale Injektionen von 1 mg des Verknüpfungsprodukts, gelöst in 0,5 ml Pi/NaCl und emulgiert in 0,5 ml vollständigem Freund's Adjuvans, sowie mit verschiedenen Verstärkern versehen, immunisiert.

#### Festphasen-Radioimmunoassay (RIA)

- 15 Dieser wurde auf Antigen-beschichteten (0,5 bis 1,0 µg/Bohrung), biegsamen V-Boden-Mikrotiter-Platten durchgeführt (vorbeschichtet mit Glutaraldehyd (0,2 %) sofern Peptide als Antigen verwendet wurden). Zunächst wurde eine Dreifachverdünnungsreihe des zu testenden Serums und anschließend mit Bolton und Hunter-Reagens (10<sup>5</sup> cpm/50 µl/Bohrung) mit <sup>125</sup>J markiertes Protein A zugegeben. Die gewaschenen und getrockneten Bohrungen der Mikrotiterplatten wurden ausgeschnitten und in einem γ-Zähler gezählt.

- 25 Bei kompetitiven Inhibitionstests wurden die Antigen-beschichteten Bohrungen mit 10-fach Verdünnungsreihen einer Lösung des zu testenden Inhibitor-Peptids in Pi/NaCl (0,1 % BSA) inkubiert, bevor jeweils die gleiche Verdünnungsstufe eines Antipeptid-Serums zugesetzt wurde.

30

#### Enzyme Labelled Immunosorbent Assay (ELISA)

- Dieser wurde ähnlich dem RIA durchgeführt, jedoch wurden Platten mit flachem Boden und eine Verbindung des Protein A mit β-Galactosidase (Amersham) anstatt der radioaktiven Markierung verwendet. Nach Zugabe des Substrats (O-Nitrophenyl-β-galactopyranosid) wurden die Platten maschinell ausgewertet.

2. Oktober 1984

- 9 -

3430894

1 Immunpräzipitation

Nach der Chloramin-T-Methode wurde Cholera-Toxin mit <sup>125</sup>J markiert (Heitmancik et al., Infect. Immun. 17, Seiten 621-628, (1977)). Die Immunpräzipitation wurde im wesentlichen nach S.W. Kessler durchgeführt (J. Immunol. 115, Seiten 1617 bis 1624 (1975)). Das <sup>125</sup>J-markierte Cholera-Toxin wurde an intakte Staphylococcus A präadsorbiert und anschließend mit verschiedenen Antiseren umgesetzt. Durch Zugabe gleicher Mengen Staphylococcus A wurden Präzipitate erhalten, die durch Gelelektrophorese auf SDS-Polyacrylamid-Gelen und anschließender Autoradiographie analysiert wurden.

Elektrophorese-Blotting-Verfahren

Auf einem 5 - 15-prozentigen SDS-Polyacrylamid-Gel in seine Untereinheiten getrenntes Cholera-Toxin wurde auf Nitrocellulose-Papier nach der Methode von Towbin et al (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, Seiten 4350 bis 4354 (1979)) übertragen. Der so hergestellte Blot wurde zur Verringerung der unspezifischen Antiserum-Bindung 1 Stunde mit 9 mM Tris HCl-Puffer, 0,9 molar NaCl, 3 % w/v BSA, pH 7,4, inkubiert, und anschließend in Streifen zerschnitten. Diese Streifen wurden 3 Stunden bei Raumtemperatur mit 1:50 Verdünnungen verschiedener Antiseren inkubiert. Nach sorgfältigem Waschen wurden die Streifen 2 Stunden mit <sup>125</sup>I-markiertem Ziegen-anti-Kaninchen-IgG (  $5 \times 10^5$  cpm/ml) inkubiert. Von den gewaschenen und getrockneten Blots wurden Autoradiogramme hergestellt.

Toxin-Neutralisierungs-Aktivität

30 I. Gefäß-Permeabilitäts-Test

Der Test wurde im wesentlichen nach J.P. Craid (J. Bacteriol. 92, Seite 795 (1966)) und C.Y. Lai (CRC Critical Reviews in Biochem. 9, Seiten 171 bis 207 (1980)) durchgeführt: Verdünnungsreihen der zu testenden Antiseren wurden mit einer konstanten Menge Cholera-Toxin vermischt, 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und 0,1 ml der Reaktionsgemische wur-

1 den erwachsenen Kaninchen an drei rasierten Hautstellen intra-  
kutan injiziert. Nach 18 Stunden wurden den Kaninchen 1 ml/kg  
5 % Evans -Blau intravenös injiziert und der Durchmesser der  
sich ergebenden blauen Verhärtung wurde 1 Stunde später ge-  
5 messen. Als Neutralisationsendpunkt wurde die höchste Serum-  
Verdünnung angesehen, die das Auftreten blauer Verhärtungen  
verhindert. Bei jedem Kaninchen wurde sowohl eine positive  
(kein Antiserum) als auch eine negative (kein Cholera-Toxin)  
Kontrolle durchgeführt.

10

#### II. Test mit abgebundenen Ileum-Schleifen

Der Test wurde im wesentlichen wie von Fujita und Finkelstein  
(J.Infect. Dis. 125, Seiten 647 bis 655 (1972)) beschrieben,  
durchgeführt. Dazu wurden Ratten oder erwachsene Kaninchen,  
15 die 12 Stunden lang gehungert hatten mit Äther anästhe-  
siert, das Abdomen geöffnet und der Dünndarm wurde in 3 bis  
4 cm lange Schleifen gebunden, wobei 10 cm vom Zwölffinger-  
darm entfernt begonnen wurde. In die Schleifen wurden ver-  
schiedene Verdünnungen der zu testenden Seren injiziert und  
20 das Abdomen wieder verschlossen. Die Seren waren vorher mit  
einer konstanten Menge Cholera-Toxin inkubiert worden.  
Nach 5 Stunden ohne Futter und Wasser wurden die Tiere ge-  
schlachtet. Durch Bestimmung der Länge und des Gewichts jeder  
Darmschleife wurde die Flüssigkeitsansammlung pro cm der  
25 Schleife bestimmt. Bei jedem Tier wurden sowohl positive  
(kein Antiserum) als/<sup>auch</sup>negative (kein Cholera-Toxin) Kontrollen  
durchgeführt.

#### Spaltung der Untereinheit B

30 Zur Festlegung der Bereiche, die an der Antigenreaktion teil-  
nehmen, wurde die Untereinheit B mit CNBr in drei Fragmente  
zerlegt: Aminosäuren 1 bis 37 und 69 bis 101, durch Disulfid-  
Brücken zwischen den Cystein-Resten an Position 9 und 86 ver-  
bunden; Aminosäuren 36 bis 68 und Aminosäuren 102 bis 103.  
35 Die Fragmente wurden auf Sephadex G-50 Säulen getrennt und  
die beiden größeren Peptide wurden auf ihre Reaktivität mit

- 1 Antiseren gegen Cholera-Toxin getestet. Das größte Peptid  
war teilweise kreuzreaktiv mit dem anti-Cholera-Toxin-Serum,  
wogegen das Peptid mit den Aminosäuren 38 bis 68 anti-  
Toxinhomologe anti-Seren inhibierte, obwohl es nicht direkt  
5 an diese anti-Seren binden konnte (nicht gezeigte Ergebnisse).

#### Auswahl von Peptiden für die Synthese

- Die Auswahl von Peptiden zur Chemo-Synthese wurde durch die  
vorstehend beschriebenen Ergebnisse mit den CNBr-Fragmenten  
10 der Untereinheit B bestimmt. Es wurde das Peptid mit den  
Aminosäuren 30 bis 42 (CTP 2) synthetisiert, da angenommen  
wurde, daß Arg 35 oder die umgebende Region an der Antikörper-  
und Rezeptor-Bindungs-Aktivität beteiligt ist (Duffy et al.,  
Biochem. Biophys. Res. Comm. 91, Seiten 1005 - 1010 (1979)).  
15 Das Peptid mit den Aminosäuren 83 - 97 (CTP 6), das Trp 88  
enthält, wurde synthetisiert, weil die chemische Modifika-  
tion dieses Restes die Bindung vom GM1 an Cholera-Toxin ver-  
hindert hatte (De Wolf et al., J. Biol. Chem. Bd. 256  
Seite 5481 - 5488 (1981)). Außerdem wurde das Peptid mit der  
20 höchsten Durchschnitts-Hydrophilizität (Aminosäurereste 79-84)  
synthetisiert, weil von solchen Sequenzen angenommen wird,  
daß sie in oder direkt benachbart zu antigenen Determinan-  
ten liegen (Hopp et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78,  
Seiten 3824 - 3828 (1981)). Da von Arnon et al. (Biochem.  
25 J. 75, Seiten 103-109 (1960)) die Antigenität von Tyrosin-  
Resten beschrieben worden war, wurden auch die Peptide, die  
die Tyrosinreste an Position 12 und Position 76<sup>enthalten</sup>/hergestellt,  
nämlich CTP 1 (Aminosäurereste 8 - 20) und CTP 5 (Aminosäu-  
rereste 75 - 85). Weil das letztere der Peptide nur 11 Amino-  
30 säurereste enthielt, wurde ein zusätzliches Peptid (CTP 4  
genannt) mit einer längeren Sequenz hergestellt (Aminosäure-  
reste 69 bis 85). Das Peptid mit den Aminosäuren 50 - 64  
(CTP 3) wurde synthetisiert, weil es ein Teil des inhibieren-  
den CNBr-Fragments mit den Aminosäuren 38 bis 68 ist.  
35

1 Synthese und Verknüpfung von Peptiden

Die synthetisierten Peptide gehören zu verschiedenen Bereichen der Untereinheit B des Cholera-Toxins (Figur 1). Die einzige Abweichung von der natürlichen Sequenz ist der Austausch von Cystein-Resten an Aminosäureposition 9 und 86 (in CTP 1 und 6) durch Alanin-Reste, um die Bildung von Aggregaten zu verhindern. Die Ergebnisse der Aminosäure-Analysen der Peptide stimmen recht gut mit den erwarteten Werten für die verschiedenen Aminosäure-Reste überein. Die Reinheit der Peptide wurde weiter durch Gegenstrom-Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) und/oder Hochspannungs-Papierelektrophorese festgestellt. Das Endprodukt enthielt weniger als 5 % Verunreinigungen. Die gereinigten Peptide wurden an Tetanus-Toxoid entweder mit einem wasserlöslichen Carbodiimid als Verknüpfungs-Reagens oder durch eine Azobindung, falls PAPA-Derivate der Peptide verwendet wurden / Der Vorteil der Bindung über PAPA-Reste ist die Spezifität der Verknüpfung, die nur zwischen den aminoterminalen Aminogruppen des PAPA und den Histidin- oder Tyrosin-Resten des Trägers vorkommt (Spirer et al., Eur. J. Immunol. 7, Seite 69 - 74 (1977)). Durch beide Verknüpfungsmethoden werden gleichwertige Produkte erhalten (Tabelle I).

25 Immunologische Reaktivität.

Die Verknüpfungsprodukte aller sechs Peptide mit Tetanus-Toxoid induzierten Antikörper, die auch auf die entsprechenden homologen Peptide spezifisch reagieren (Figur 2). Die stärkste Immunantwort wurde bei CTP 1 und CTP 6 beobachtet (Figur 2). Vier der Antiseren waren außerdem in verschiedenem Ausmaß gegenüber der vollständigen Untereinheit B und dem vollständigen nativen Cholera-Toxin kreuzreaktiv. Diese Kreuzreaktivität wurde durch drei Tests nachgewiesen: Festphasen-radioimmunoassay (Figur 2), Immuno-Blotting-Technik (Figur 3) und Immunpräzipitation (Tabelle II). Alle drei Methoden ergaben ähnliche Resultate.

- 1 Das Peptid CTP 3 induzierte Antikörper, die eine starke Kreuzreaktivität mit dem intakten Toxin zeigten. Diese war in ihrem Ausmaß vergleichbar mit der anti-Peptid-Reaktion auf homologe Peptide (Figur 2). Sowohl die anti-Peptid-Reaktion auf homologe Peptide als auch die Kreuzreaktivität sind natürlich spezifisch, denn sie können vollständig durch Zugabe eines Überschusses freien CTP 3 Peptids inhibiert werden (Figur 4). Außerdem ist CTP 3 das einzige der untersuchten Peptide, das mit Antiserum gegen intaktes natives Cholera-Toxin (Figur 5) reagierte. Daraus folgt, daß die Kreuzreaktivität mit einem nativen Protein nicht typisch für jedes der aus ihm abgeleiteten Segmente ist.

15 Dies wird weiter durch einen Vergleich der verwandten Peptide CTP 4 (Aminosäureposition 69 - 85) und CTP 5 (Aminosäureposition 75 - 85) <sup>bestätigt.</sup> Obwohl ein Antiserum gegen CTP 5 einen hohen Titer gegenüber dem homologen Peptid hatte, kreuzreagierte es weder mit der Untereinheit B noch mit dem Gesamt-Toxin. Die Verlängerung dieses Peptids um sechs Aminosäurereste ergab CTP 4, das Antikörper hervorrief, die mit den intakten Proteinen kreuzreagierten, obwohl die homologen anti-Peptid-Titer nicht deutlich höher waren als im Falle von CTP 5.

- 25 Die Ergebnisse der Immunpräzipitations-Experimente (Tabelle II) erläutern die quantitative Seite der Kreuzreaktivität zwischen den anti-Peptid-Antikörpern und dem Cholera-Toxin. Die anti-Peptid CTP 3-Antikörper zeigen tatsächlich die höchste Kreuzreaktivität. Diese beträgt ungefähr 30 % der homologen Toxin-anti-Toxin-Reaktion. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus dem RIA sind anti-CTP 1- und -CTP 6-Antikörper signifikant kreuzreaktiv mit dem intakten Toxin, wogegen die restlichen Peptide nur geringe Reaktivität zeigen. Das Amino-Blott-Experiment bestätigt diese Ergebnisse und gibt einen zusätzlichen interessanten Hinweis. Weil in diesem Fall das intakte Cholera-Toxin durch Elektro-

- 1 phorese vor der Wechselwirkung mit den verschiedenen Antiseren  
in seine beiden Untereinheiten zerlegt wurde, ist aus den Er-  
gebnissen klar, daß ein Antiserum gegen CTP 1 nicht nur mit  
der Untereinheit B, sondern auch in einem bemerkenswerten  
5 Ausmaß mit der Untereinheit A des Cholera-Toxins reagiert.

#### Inhibition der Adenylat-Cyclase-Aktivität

- Weil die Diarrhoe als Reaktion auf CT oder LT ein Ergebnis  
der Aktivierung der Adenylat-Cyclase in der Zellmembran der  
10 Epithel-Zellen des Dünndarms ist, wurde bestimmt, inwieweit  
die verschiedenen Antisera CT-induzierte oder LT-induzierte  
Adenylat-Cyclase-Aktivität inhibieren. Die Enzymaktivität wur-  
de durch Bestimmung des Ausmaßes der cAMP-Produktion in dis-  
pergierten Hühner-Nieren-Zellen ermittelt. Wie in Tabelle V  
15 gezeigt, inhibieren Antiseren gegen CTP 1 und CTP 3 spezi-  
fisch die CT-induzierte Adenylat-Cyclase-Aktivität bis zu  
etwa 60 bis 65 %. Dasselbe gilt für die LT-induzierte Adeny-  
lat-Cyclase-Aktivität, denn anti-CTP1- und anti-CTP3-Anti-  
körper inhibieren diese Aktivität spezifisch in einem ähn-  
20 lichen Ausmaß.

#### Neutralisation der biologischen Aktivität

- Die Fähigkeit biologische Effekte des Cholera-Toxins zu neu-  
tralisieren wurde für die Seren gegen die verschiedenen  
25 Peptide ermittelt. Dazu wurden zwei in vivo-Tests der Cholera-  
Toxin-Aktivität angewendet, nämlich ein Hauttest, bei dem  
die verstärkte Gefäßpermeabilität, die durch das Toxin her-  
vorgerufen wird, gemessen wird, und außerdem ein Test, bei  
dem die Flüssigkeitsansammlung, die vom Cholera-Toxin in ab-  
30 gebundenen Dünndarmschleifen erwachsener Kaninchen induziert  
wird, gemessen wird. Die Ergebnisse dieser beiden Experimen-  
te werden in den Tabellen III und IV gezeigt. In beiden Fäl-  
len verursachten anti-CTP 3-Antikörper eine teilweise Inhibi-  
tion der Toxin-Aktivität. Obwohl das anti-CTP 3-Antiserum  
35 weniger wirksam gegen natives Cholera-Toxin war als gegen  
dieses gerichtetes Antiserum, verhinderte es doch bis zu 40 %

1 der Flüssigkeitsansammlung im Kaninchendarm. Obwohl diese bei-  
den Tests in vivo durchgeführt worden sind, beweisen sie le-  
diglich die Gegenwart von Antikörpern in den Seren der immuni-  
sierten Kaninchen. Das Peptid CTP 3, / <sup>dessen Antikörper</sup> die stärkste immuno-  
5 logische Kreuzreaktion mit Cholera-Toxin zeigten, hat eine  
bemerkenswerte Fähigkeit, Antikörper zu induzieren, die die  
biologische Aktivität des Cholera-Toxins neutralisieren. Es  
kann für die Induktion eines immunologischen Schutzes gegen-  
über diesem Toxin verwendet werden.

10

Die vorstehend beschriebenen Versuche zeigen, daß die erfin-  
dungsgemäß hergestellten synthetischen Impfstoffe für die  
Impfung gegen Cholera-Toxin verwendet werden können. Die zur  
Impfung von Menschen erforderliche Menge des am Träger gebun-  
15 den Polypeptids beträgt etwa 2 bis 20 mg. Es ist klar, daß  
das Verknüpfungsprodukt in einem geeigneten Trägermaterial  
mit geeignetem Adjuvans angewendet werden muß.

20

25

30

35

1

Tabelle I

Eigenschaften verschiedener Verbindungen von Peptiden mit Tetanus-Toxoid  
(MW 150 000)

5

Peptid	Position	Verknüpfungs- Methode	Peptid/Träger-Verhältnis	
			zur Verknüpfung verwendet (mol/mol)	im Verknüpfungs- produkt (mol/mol)
BP <sub>1</sub>	8-20	PAPA*	95	54
..		EDCI**	40	27
BP <sub>2</sub>	30-42	EDCI	45	11
BP <sub>3</sub>	50-64	PAPA	94	63
		EDCI	41	14
BP <sub>4</sub>	69-85	EDCI	40	19
BP <sub>5</sub>	75-85	EDCI	35	10
BP <sub>6</sub>	83-97	PAPA	75	25
		EDCI	49	24

20

\* PAPA = p-Aminophenylelessigsäure, die an das Peptid über eine Amid-Bindung gebunden ist und nach der Diazotierung mit dem Protein verbunden wird

\*\* EDCI = 1-Äthyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-hydrochlorid

25

Tabelle II

Immunpräzipitation von <sup>125</sup>J-Cholera-Toxin durch verschiedene Antipeptidseren

Serum	gefälltes <sup>125</sup> J-Cholera-Toxin	
	cpm	% der Gesamt-Radioaktivität
30	anti-CTP1	41880
	anti-CTP2	9119
	anti-CTP3	66498
	anti-CTP4	4956
	anti-CTP5	2980
35	anti-CTP6	47813
	anti-Cholera-Toxin	221560
	Präimmun-Serum	2694

1

Tabelle III

Inhibition Cholera-Toxin induzierter Gefäß-Permeabilität in der  
Kaninchenhaut durch anti-CTP 3-Peptid-Antikörper

5

Immunitätstest (ng Toxin)	Gefäß-Permeabilitäts-Reaktion		
	anti-Cholera-Toxin <sup>b</sup>	anti-CTP 3 <sup>b</sup>	Präimmun-Serum <sup>b</sup>
0,5	-	-	+++
1,0	-	+	+++
2,0	-	+++	+++
3,0	-	+++	+++

10

- <sup>a</sup> +++ starke blaue Verhärtung  
+ schwache blaue Verhärtung  
- keine Blaufärbung

15

- <sup>b</sup> Alle Seren wurden in der Verdünnung 1 : 10 eingesetzt

20

25

30

35

Tabelle IV

Neutralisation von Cholera-Toxin durch Antiseren gegen das Peptid CTP 3  
(Aminosäureposition 50 - 64)

	Cholera- Toxin (µg)	Serum	Verdün- nung	Gewicht/cm Schleife	Reduzierte Sekretion (%)
5	0,0	keins (Kochsalzlösung)		0,20	
	1,5	keins (Kochsalzlösung)		1,30	
10	1,5	anti-Cholera-Toxin	1:20	0,45	
	1,5	anti-CTP 3	1:2	1,02	40
	1,5	normales Kaninchen-Serum	1:2	1,25	
	3,0	keins (Kochsalzlösung)		1,36	
15	3,0	anti-Cholera-Toxin	1:20	0,51	
	3,0	anti-CTP 3	1:2	1,08	33
	5,0	keins (Kochsalzlösung)		1,42	
	5,0	anti-Cholera-Toxin	1:20	0,58	
	5,0	anti-CTP 3	1:2	1,32	12
20	7,5	keins (Kochsalzlösung)		1,42	
	7,5	anti-Cholera-Toxin	1:20	0,60	
	7,5	anti-CTP 3	1:2	1,32	12
	10,0	keins (Kochsalzlösung)		1,50	
25	10,0	anti-Cholera-Toxin	1:20	0,69	
	10,0	anti-CTP 3	1:2	1,50	0

a) Voraussgesetzt, daß die Reduktion, die durch das Antiserum gegen  
Cholera-Toxin hervorgerufen wird, 100 % ist.

1

Tabelle V

Spezifität der cAMP Inhibition durch Antiseren

5

cyclisches AMP induziert durch:

10

Antiserum zugegeben	Cholera-Toxin			Parathyroid-Hormone		Isoproterenol	
	pmol / 250000 Zellen %		Signi- fikanz (p) <sup>a</sup>	pmol / 250000 Zellen	%	pmol / 250000 Zellen	%
keins	5,9 <sup>b</sup>	100		3,7	100	4,8	100
NRS	5,6	95	n.s. <sup>c</sup>	3,5	94	4,6	95
CT	0,5	8	0,001	3,8	100	4,6	95
15 CTP1	3,2	54	0,01	3,7	100	4,7	98
CTP3	2,5	42	0,01	3,5	94	4,6	95
TT	5,6	95	n.s.	n.t. <sup>d</sup>		n.t.	

20

a Signifikanz der Differenz zwischen Cholera-Toxin-induziertem cAMP ohne Antiserum und mit einem der angewendeten Antiseren

b Werte entsprechen dem Mittel aus drei Versuchen

25

c n.s.- nicht signifikant

d n.t.-nicht getestet.

30

35

1 Kurze Beschreibung der Zeichnungen:

Figur 1 zeigt die Aminosäuresequenz der Untereinheit B des Cholera-Toxins;

5

Figur 2 veranschaulicht die Antikörper-Antwort von Kaninchen auf verschiedene Peptide der Untereinheit B des Cholera-Toxins;

10 Figur 3 erläutert die Kreuzreaktivität verschiedener Peptide, die durch die Immuno-Blott-Methode ermittelt wurde;

15 Figur 4 erläutert die Kreuzreaktivität der Peptide und die Inhibition durch eines der synthetischen Peptide;

Figur 5 erläutert die Reaktivität des Peptids mit den Aminosäuren 50 - 64 mit Antiserum gegen Cholera-Toxin.

20

Reaktionen mit: ■ - homologen Peptiden;  
▲ - der Untereinheit B des Cholera-Toxins;  
und 0 - Cholera-Toxin.

25 Bei allen Peptiden mit Ausnahme von CTP 3 ist der Unterschied in den Maßstäben für <sup>die</sup> Reaktionen zwischen dem Peptid und den intakten Proteinen zu beachten.

30

35

23

21

Nummer: 34 30 894  
 Int. Cl.<sup>3</sup>: A 61 K 39/116  
 Anmeldetag: 22. August 1984  
 Offenlegungstag: 14. März 1985

Primär-Struktur der Untereinheit B

Thr - Pro - Gln - Asn - Ile - Thr - Asp - <sup>10</sup>Leu - Cys - Ala - Glu - Tyr - His - Asn -  
 Thr - Gln - Ile - His - Thr - <sup>20</sup>Leu - Asn - Asn - Lys - Ile - Phe - Ser - Tyr - Thr -  
 Glu - <sup>30</sup>Ser - Leu - Ala - Gly - Lys - Arg - Glu - Met - Ala - [Ile - <sup>40</sup>Ile - Thr - Phe -  
 Lys - Asn - Gly - Ala - Thr - Phe - Glu - <sup>50</sup>Val - Glu - Val - Pro - Gly - Ser - Gln -  
 His - Ile - Asp - <sup>60</sup>Ser - Gln - Lys - Lys - Ala - [Ile - Glu - Arg - Met - <sup>70</sup>Lys - Asn -  
 Thr - Leu - Arg - Ile - Ala - Tyr - Leu - Thr - Glu - <sup>80</sup>Ala - Lys - Val - Glu - Lys -  
 Leu - Cys - Val - Trp - Asn - <sup>90</sup>Asn - Lys - Thr - Pro - His - Ala - Ile - Ala - Ala -  
<sup>100</sup>Ile - Ser - Met - Ala - <sup>103</sup>Asn

Fig. 1

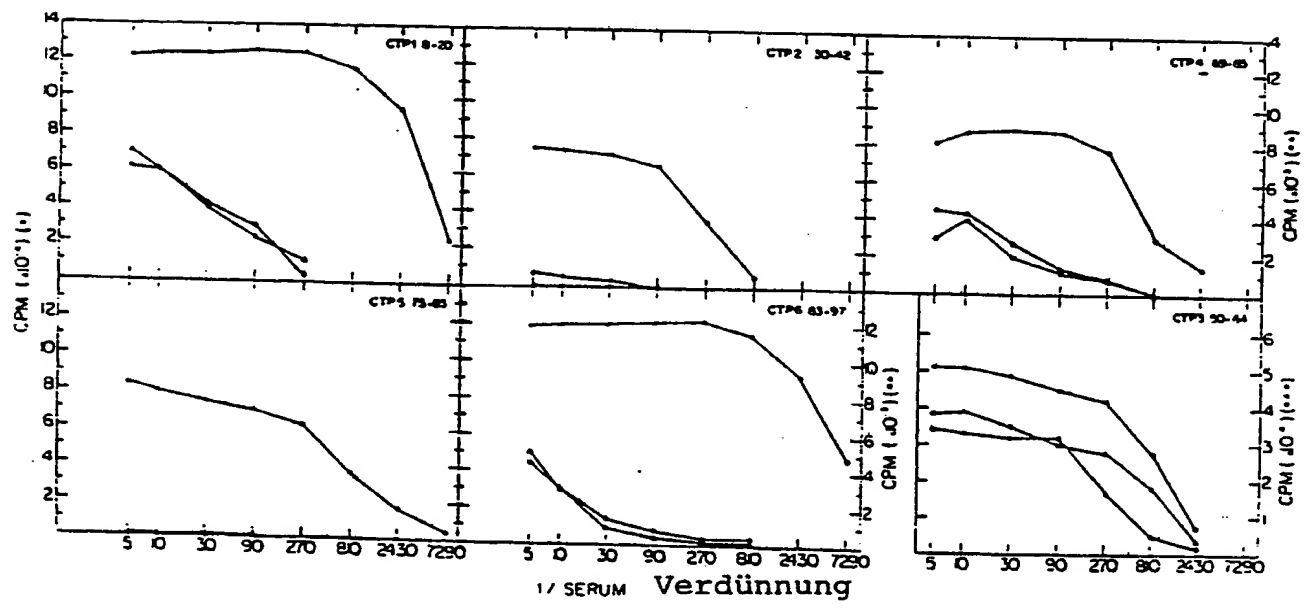


Fig. 2

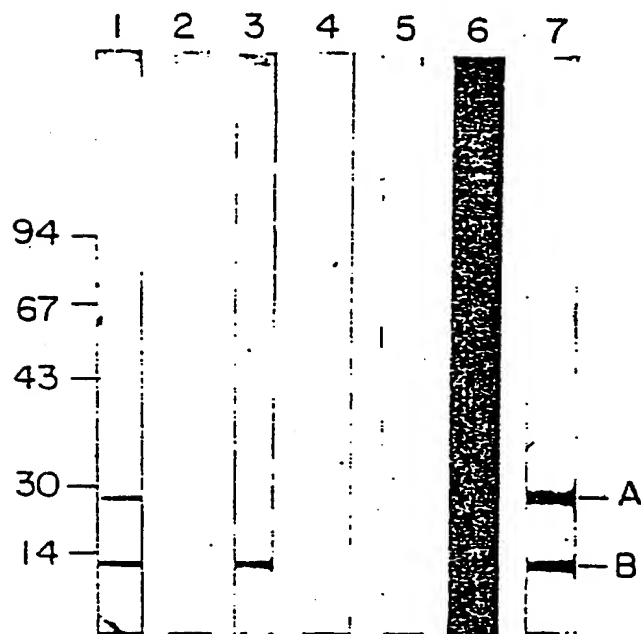


Fig. 3

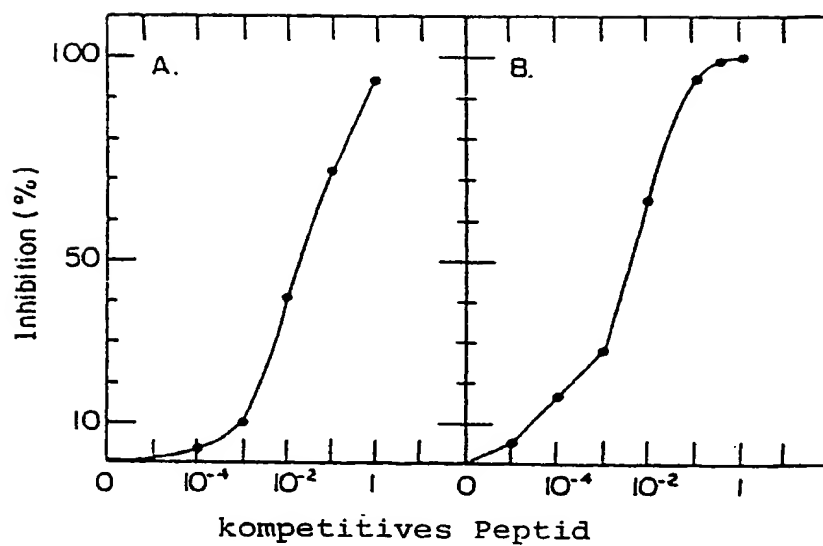


Fig. 4

~~23~~  
22

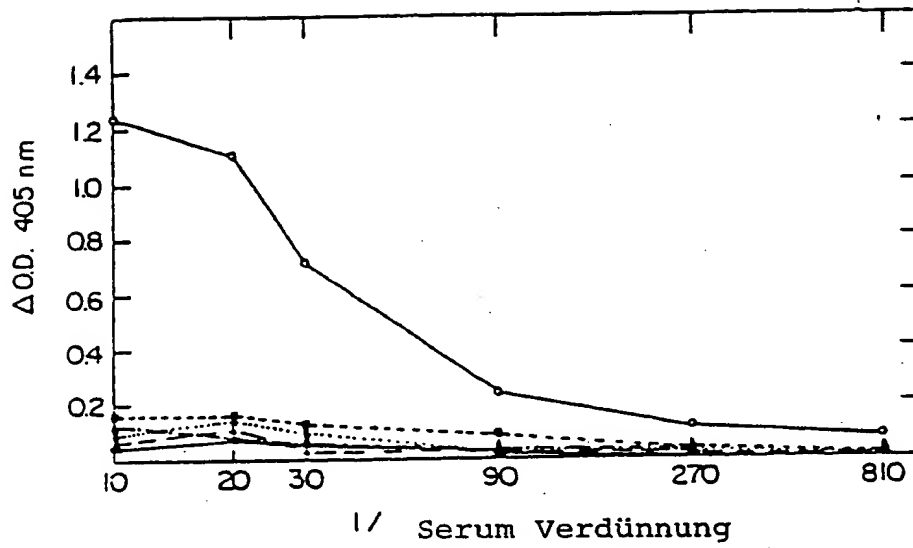


Fig. 5